

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平7-289253

(43) 公開日 平成7年(1995)11月7日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 N 9/06	B			
C 0 7 C 229/46		7537-4H		
C 1 2 N 1/14	A	8828-4B		
C 1 2 Q 1/26		6807-4B		
// (C 1 2 N 9/06				

審査請求 未請求 請求項の数16 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号	特願平7-42880	(71) 出願人	000141897 株式会社京都第一科学 京都府京都市南区東九条西明田町57番地
(22) 出願日	平成7年(1995)3月2日	(72) 発明者	加藤 暢夫 京都府亀岡市西つづじヶ丘美山台2丁目3番18号
(31) 優先権主張番号	特願平6-33488	(72) 発明者	阪井 康能 滋賀県大津市本宮2丁目40-8
(32) 優先日	平6(1994)3月3日	(72) 発明者	谷 ▲吉▼樹 京都府京都市北区上賀茂菟蓐園町56, 60番合地-1
(33) 優先権主張国	日本 (J P)	(74) 代理人	弁理士 青山 葆 (外2名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ及びその製造方法

(57) 【要約】

【構成】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するフサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル N^o-Z-リジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ (F L O D)、その製造方法、該 F L O D を用いるアマドリ化合物の分析法、該分析法のための試薬及びキット。

【効果】 新たな臨床分析及び食品分析法の開発に有用であり、特に糖尿病の病状の診断及び症状の管理、食品の品質管理の促進に寄与し得る。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するフサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌をフルクトシルリジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 2】 フルクトシルリジン含有培地が、グルコースと、リジン及び／又は N° -Z-リジンとを温度 100～150℃において 3～60 分間オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジンを含有するものである請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 3】 フサリウム属の菌が、フサリウム・オキシスポルム S-1 F 4 (*Fusarium oxysporum* S-1 F 4) (FERM BP-5010) である請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 4】 下記の理化学的特性を有するものである請求項 1、2 又は 3 に記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；

2) 安定 pH は 4.0～12.0、至適 pH は 8.0 であり；

3) 安定温度は 20～55℃、至適温度は 45℃であり；

4) セファクリル S-200 カラムを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約 45,000 (45 kDa) である。

【請求項 5】 ギベレラ属の菌が、ギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6356) (*Gibberella fujikuroi*) 又はギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6605) (*Gibberella fujikuroi*) である請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【請求項 6】 下記の理化学的特性を有するものである請求項 1、2 又は 5 に記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；

2) 至適 pH は 8.0 であり；

3) 安定温度は 20～50℃、至適温度は 35℃であり；

4) スーパーデックス 200 pg を用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約 47,000 (47 kDa) である。

【請求項 7】 フサリウム・オキシスポルム S-1 F 4 (*Fusarium oxysporum* S-1 F 4) (FERM BP-5010)。

【請求項 8】 単糖類と、遊離あるいは保護基を有する

アミノ酸とを溶液中で共存させ、高温加圧処理することを特徴とする糖化アミノ酸の製造方法。

【請求項 9】 グルコース 0.01～50 重量%とリジン及び／又は N° -Z-リジン 0.01～20 重量%とを溶液中で 100～150℃において 3～60 分間オートクレーブ処理することによりフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジンを製造することを特徴とする請求項 8 記載の方法。

【請求項 10】 グルコース 0.01～50 重量%、リジン及び／又は N° -Z-リジン 0.01～20 重量%、 K_2HPO_4 0.1 重量%、 NaH_2PO_4 0.1 重量%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05 重量%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01 重量%及び酵母エキスを含有する混合物を 100～150℃において 3～60 分間オートクレーブ処理することにより得られることを特徴とする、フルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン含有培地。

【請求項 11】 遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び／又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法。

【請求項 12】 フサリウム属又はギベレラ属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有する菌株をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする請求項 11 記載の方法。

【請求項 13】 アマドリ化合物を含有する試料と、請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法。

【請求項 14】 試料が生体成分であり、アマドリ化合物の分析が、該生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量によりなされることを特徴とする請求項 13 記載の方法。

【請求項 15】 請求項 1 記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを含有するアマドリ化合物の分析のための試薬又はキット。

【請求項 16】 生体成分中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量のために用いられることを特徴とする請求項 15 記載の分析試薬又はキット。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】 本発明は、新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼに関し、さらに詳しくは、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、該酵素の製造方法、該酵素を用いたアマドリ化合物の分析法、及び該

酵素を含有する試薬及びキットに関する。また本発明は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養のために有用な、該酵素の基質としてのフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^ε-Z-リジンの製造方法、並びにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養のためのフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^ε-Z-リジン含有培地を提供するものである。

【0002】

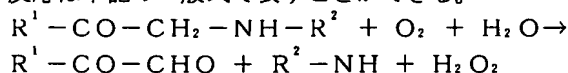
【従来技術】アマドリ化合物は、タンパク質、ペプチド及びアミノ酸のようなアミノ基を有する物質と、アルドースのような還元性の糖が共存する場合、アミノ基とアルデヒド基が非酵素的かつ非可逆的に結合し、アマドリ転移することにより生成される。アマドリ化合物の生成速度は、反応性物質の濃度、接触時間、温度などの関数で表される。従って、その生成量から、それら反応性物質を含有する物質に関する様々な情報を得ることができると考えられている。アマドリ化合物を含有する物質としては、醤油等の食品、及び血液等の体液がある。生体では、グルコースとアミノ酸が結合したアマドリ化合物であるフルクトシルアミン誘導体が生成している。例えば、血液中のヘモグロビンが糖化されたフルクトシルアミン誘導体はグリコヘモグロビン、アルブミンが糖化された誘導体はグリコアルブミン、血液中のタンパクが糖化された誘導体はフルクトサミンと呼ばれる。これらの血中濃度は、過去の一定期間の平均血糖値を反映しており、その測定値は、糖尿病の病状の診断及び症状の管理の重要な指標となり得るために、測定手段の確立は臨床、極めて有用である。また、食品中のアマドリ化合物を定量することにより、その食品の製造後の保存状況や期間を知ることができ、品質管理に役立つと考えられる。このように、アマドリ化合物の定量分析は医学及び食品を含む広範な分野で有用である。

【0003】従来、アマドリ化合物の定量法としては、高速液体クロマトグラフィを利用する方法 [Chromatogr. Sci. 10:659(1979)]、ホウ酸を結合させた固体をつめたカラムを用いる方法 [Clin. Chem. 28:2088(1982)]、電気泳動 [Clin. Chem. 26:1598(1980)]、抗原-抗体反応を利用する方法 [J. J. C. L. A. 18: 620(1993), 機器・試薬 16: 33-37(1993)]、フルクトサミンの測定法 [Clin. Chem. Acta 127: 87-95 (1982)]、チオバルビツール酸を用いて酸化後比色定量する方法 [Clin. Chem. Acta 112: 179-204 (1981)]などが知られているが、高価な機器が必要であったり、必ずしも正確で迅速な方法ではなかった。

【0004】近年、酵素の有する特性（基質、反応、構造、位置などの特異性）に起因して、選択的に目的物質を迅速かつ正確に分析することができることから、酵素反応を利用する方法が臨床分析や食品分析の分野で普及してきた。既に、アマドリ化合物に酸化還元酵素を作用させ、その反応における酵素の消費量又は過酸化水素の

発生量を測定することにより、アマドリ化合物を定量する分析法が提案されている（例えば、特公平 5-33997号公報、特公平 6-65300号公報、特開平 2-195900号公報、特開平 3-155780号公報、特開平 4-4874号公報、特開平 5-192193号公報、特開平 6-46846号公報）。さらに、糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量法も開示されている（特開平 2-195899号公報、特開平 2-195900号公報、特開平 5-192193号公報、特開平 6-46846号公報）。

【0005】アマドリ化合物の酸化還元酵素による分解反応は下記の一般式で表すことができる。



（式中、R¹はアルドース残基、R²はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す）

上記の反応を触媒する酵素として、例えば、菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ [コリネバクテリウム (*Corynebacterium*) 属の菌 (特公平 6-65300号公報、特公平 5-33997号公報)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) の菌 (特開平 3-155780号公報)]、菌由来のケトアミノオキシダーゼ [コリネバクテリウム属、フサリウム属、アクレモニウム属又はデブリオマイセス属 (特開平 5-192193号公報)] カンジダ (*Candida*) 属の菌由来のフルクトシルアミンデグリガーゼ (特開平 6-46846号公報)、及びアルキルリジンナーゼ [J. Biol. Chem. 239巻、第 3790-3796 頁 (1964年) 記載の方法で調製可能] 等を挙げることができる。

【0006】

【発明が解決すべき課題】しかしながら、これらの酵素による方法には、下記の問題点があった。即ち、糖尿病の診断における指標となる、血中のアマドリ化合物は糖化タンパクであるが、これは、通常、タンパク分子中のリジン残基の ε 位にグルコースが結合して生成される

[J. Biol. Chem. 26:13542-13545(1986)]。従って、糖化タンパクの測定には、フルクトシルリジンに対する特異性の高い酵素を用いる必要があった。しかし、既存のコリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、他のアマドリ化合物に対する活性に比べて、フルクトシルリジンに対する活性が低く（後述の表 5 参照）、糖化タンパク又はその加水分解物に対する作用については明らかにされていない。他方、特開平 5-192193号公報記載のケトアミノオキシダーゼはフルクトシルバリンの α-アミノ基の糖化に対して特異的に作用する酵素であり、リジン残基に糖が結合している糖化タンパクを正確に測定することはできない。フルクトシルアミンデグリガーゼは、ジフルクトシルリジンに高い活性があるのでリジン残基の ε 位の

糖化物を特異的に測定することができない。さらに、アルキルリジナーゼを用いる方法は糖類以外がリジンに結合した物質に対しても作用し、糖化物に対する特異性が低いという問題があり、正確な測定が期待できなかった。このように、従来の酵素は糖化タンパクの正確な定量には適さず、フルクトシルリジンに対する特異性が高い酵素の開発が待たれていた。一般的に、酵素を用いる分析法が正確かつ有用となるためには、分析の目的に最適な酵素を選択する必要がある。即ち、酵素の基質である被検物質の種類、測定試料の状態、測定条件など、種々の条件を考慮して適切な酵素を用いなければ、再現性のある正確な分析を行う事ができない恐れがある。そのような酵素を選択するためには、予め様々な酵素について、活性、基質特異性、温度安定性、pH安定性などが特定されていなければならない。従って、より多くのフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを製造し、それらの特性を明らかにしておくことが望ましい。

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アマドリ化合物、特に糖化タンパクに特異的に作用する新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジンの存在下で培養すると、目的の酵素が産生されることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はギベレラ属 (*Gibberella*) の菌を、フルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供するものである。本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌の培養に用いるフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジン含有培地は、グルコースと、リジン及び／又は N[°]-Z-リジンとを温度 100~150℃において 3~60 分間、オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジン (以下、FZL と略称することもある) を含有する。従って、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼはフルクトシルリジン及び／又は FZL に特異的に作用する酵素である。なお、本明細書中では、本発明のフルクトシルリジン及び／又は FZL に特異的なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをフルクトシルリジン・オキシダーゼ (fructosyl lysine oxidase) と同意義に用いることとし、以下、FLOD と略称することもある。本発明の酵素は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するフサリウム属又はギベレラ属の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジン含有培地で培養することにより製造することができる。

【0008】そのようなフサリウム属の菌として、フサ

リウム・オキシスポルム S-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) (FERM BP-5010) を挙げることができる。また、ギベレラ属の菌として、ギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6356) (*Gibberella fujikuroi*) 又はギベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6605) (*Gibberella fujikuroi*) などの種を挙げることができる。

【0009】本発明はまた、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養のために有用な、該酵素の基質としてのフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジンの製造方法、並びにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌の培養のためのフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジン含有培地を提供するものである。従来、糖化タンパクは特開平 2-69664 記載の方法で化学合成されているが、合成には 8 日間以上を要し、操作が複雑で実用的でなかった。本発明者らは、単糖類と、遊離あるいは保護基を有するアミノ酸とを溶液中で共存させ、100~150℃でオートクレーブ処理することにより、糖化アミノ酸を容易に製造することができることを見出した。例えば、グルコースと、リジン及び／又は N[°]-Z-リジンとを溶液中でオートクレーブ処理することにより、目的のフルクトシルリジン及び／又は FZL が容易に得られる。本発明の目的から、N[°]-Z-リジンがより好ましい。従って、本発明は、単糖類と、遊離あるいは保護基を有するアミノ酸とを溶液中で共存させ、100~150℃でオートクレーブ処理することの特徴とする、糖化アミノ酸の製造方法を提供するものである。また、本発明は、グルコース 0.01~50 重量%と N[°]-Z-リジン 0.01~20 重量%とを溶液中で、100~150℃において 3~60 分間オートクレーブ処理することの特徴とするフルクトシル N[°]-Z-リジンの製造方法を提供するものである。

【0010】上記のごとく、フルクトシルリジン及び／又は FZL はグルコース 0.01~50 重量%とリジン及び／又は N[°]-Z-リジン 0.01~20 重量%とを含む水溶液を、100~150℃において 3~60 分間オートクレーブ処理することにより、0.01~0.5% のフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N[°]-Z-リジン水溶液として得ることができる (図 1)。好ましくは、全量 1000ml の溶液中にグルコース 200g、N[°]-Z-リジン 10g を溶解させ、通常、120℃、20 分間オートクレーブ処理する。精製フルクトシル N[°]-Z-リジンは、上記の本発明の方法で得られた FZL 水溶液を逆相クロマトグラフィ又はイオン交換クロマトグラフィで精製することにより、得ることができる。フルクトシルリジン及び／又は FZL 含有培地は、上記の本発明の方法で得られたフルクトシルリジン及び／又は FZL を通常の培地に添加することによっても調製できるが、適当な混合物、即ち、グルコース 0.

0.1~5.0重量%、リジン及び／又はN^o-Z-リジン 0.01~2.0重量%、K₂HPO₄ 0.1重量%、NaH₂PO₄ 0.1重量%、MgSO₄・7H₂O 0.05重量%、CaCl₂・2H₂O 0.01重量%及び酵母エキス 0.2重量%を含有する混合物（好ましくはpH5.6~6.0）を100~150℃において3~60分間オートクレーブ処理することによっても得られる。該培地は新規であり、フルクトシルリジン及び／又はFZLを基質とするFLOD産生菌のスクリーニング及び／又は培養に有用であり、FLODの開発及び研究に貢献するものである。本発明の培地は、該培地で増殖可能なあらゆる種類の菌のスクリーニングに使用することができ、そのような菌として、真菌類、例えば、フサリウム属 (*Fusarium*)、ギベレラ属 (*Gibberella*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 等、細菌類、例えばコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) 等の菌を挙げることができるが、これらに限定されない。従って、本発明はまた、上記の培地を提供するものである。

【0011】本発明のFLODの製造に用いる培地としては、炭素源、窒素源、無機物、その他の栄養源を含有する通常の合成あるいは天然の培地を用いることができる。炭素源としては、例えば、グルコース、キシロース、グリセリン等、窒素源としては、ペプトン、カゼイン消化物、酵母エキス、等を用いることができる。さらに無機物としてはナトリウム、カリウム、カルシウム、マンガン、マグネシウム、コバルト等、通常の培地に含有されるものを用いることができる。本発明のFLODは、フルクトシルリジン及び／又はFZL含有培地で培養したとき、最もよく誘導される。好ましい培地の例として、本発明方法で得られるフルクトシル N^o-Z-リジン (FZL) を単一の窒素源とし、炭素源としてグルコースを用いるFZL培地 (1.0%グルコース、0.5%FZL、1.0%K₂HPO₄、0.1%NaH₂PO₄、0.05%MgSO₄・7H₂O、0.01%CaCl₂・2H₂O及び0.01%ビタミン混合物)を挙げることができる。特に好ましい培地は、全量1,000ml中にグルコース20g、FZL 10g、K₂HPO₄ 1.0g、NaH₂PO₄ 1.0g、MgSO₄・7H₂O 0.5g、CaCl₂・2H₂O 0.1g及び酵母エキス2.0gを含有する培地 (pH5.6~6.0) である。FZL含有培地は、通常の培地にFZLを添加するか、グルコースとN^o-Z-リジンとを含有する培地をオートクレーブ処理することによって調製することができる。いずれの方法によっても得られる培地はフルクトシルリジン及び／又はFZLの存在によって褐色を呈していることから、FZL褐変培地又はGL (グリケーテッドリジン及び／又はグリケーテッドN^o-Z-リジン) 褐変培地と呼称される。

【0012】培養は、通常、25~37℃、好ましくは

28℃で行われる。培地のpHは4.0~8.0の範囲であり、好ましくは5.5~6.0である。しかしながら、これらの条件は、それぞれの菌の状態に応じて適宜調整されるものであり、上記に限定されない。例えば、フサリウム・オキシスポルムS-1F4をこのような条件下、20~40時間、好ましくは24時間培養すると、FLODが培養培地に蓄積されるが、上記の好適な培地で24時間培養したとき、FLODの産生は最大になった (図2参照)。このようにして得られた培養物は、常法に従い、核酸、細胞壁断片等を除去し、酵素標品を得ることができる。通常、酵素活性は菌体中に蓄積されるので、培養物中の菌を磨砕し、酵素を抽出する。細胞の磨砕は、機械的手段又は溶媒を利用した自己消化、凍結、超音波処理、加圧などのいずれでもよい。酵素の分離精製法も既知であり、硫酸などを用いる塩析、エタノール等の有機溶媒による沈殿、イオン交換クロマトグラフィやゲルろ過、アフィニティークロマトグラフィなどを、適宜組み合わせで行う。例えば、培養物を、遠心又は吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH8.5) に懸濁し、ダイノミルによって菌糸体を破碎する。次いで、遠心分離した上清を無細胞抽出液として、硫酸分画、DEAE-セファセルイオン交換クロマトグラフィで処理することにより精製する。

【0013】しかしながら、本発明の目的から、FLODは、その精製度にかかわらず、アマドリ化合物の酸化反応を触媒することができる限り、培養液をはじめとする、あらゆる精製段階の酵素含有液を包含する。また、酵素分子の内、触媒活性に関与する部位のみでも、本発明目的を達成することができることから、任意の、アマドリ化合物酸化活性を有するフラグメントをも包含するものとする。このようにして得られたFLODは、アマドリ化合物の定量、特に糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量に有用である。従って、本発明は、遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び／又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。さらに、本発明は、フサリウム属又はギベレラ属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生することができる菌株をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^o-Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。これらの属の菌株が産生するFLODはいずれも本発明が解決すべき技術的な課題の解決に有用である。しかしながら、その理化学的な性質がやや異なっており、本明細書では、適宜、必要に応じてフサリウム・オキシスポルムS-1F4由来のFLODをFLOD-S、ギベレラ・フジクロイ由来のFLODをFLOD-

Gと呼称する。以下、本発明を詳しく説明する。

【0014】(1)フサリウム・オキシスポルムS-1F4によって産生されるFLOD類該FLOD類は一般に、下記の理化学的特性を有する。

1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；

2) 安定pHは約4.0～12.0、至適pHは8.0であり；

3) 安定温度は約20～55℃、至適温度は45℃であり；

4) セファクリルS-200カラムを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約45,000(45kDa)である。

【0015】本発明のFLOD-Sを産生する菌である、フサリウム・オキシスポルムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4) (以下、S-1F4株と称する)は本発明者らが土壤中より新規に単離した菌株であり、その菌学的特性は以下の通りである。菌の分類は、おおむねブース(C. Booth)著の「ザ・ジナス・フサリウム(The Genus *Fusarium*)」(CMI, 1971)の記述に準拠した。

(1) 培地における生育状況

PDA培地、ポテト・スクロース寒天培地、オートミール培地における生育はいずれの培地でも非常に良好である。25℃の恒温器で7日間培養すると、フェルト状にペトリ皿全体に広がり、白～薄い紫色を呈する。

(2) 分類学的性質

分離した菌の同定は、微生物をオートミール培地で培養し、分生子(conidia)や分生子柄(conidiophor)などの顕微鏡下の形態観察から行った。その結果、S-1F4株のコロニーの色は白色から薄い紫色であり、マイクロコニディア(microconidia)とマクロコニディア(macroconidia)及び厚膜胞子を多数形成する、マクロコニディアの形状が三日月型であり、3～5の隔壁を有していること、マイクロコニディアの形状が卵～長円形であり、小型分生胞子を擬頭状に形成することから、フサリウム・オキシスポルム (*Fusarium oxysporum*)と同定された。

本菌株は、工業技術院生命工学工業技術研究所に、受託番号FERM BP-5010 (寄託日：平成6年2月24日)の下で寄託されている。

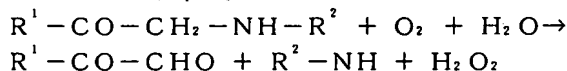
【0016】S-1F4株により、本発明方法に従って産生されたFLOD-Sの特性を詳細に説明する。

1. 一般的な誘導特性

FLOD-Sはフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N^o-Z-リジン(FZL)によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び／又はFZLを窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び／又はFZL含有培地で、フサリウム・オキシスポルムS-1F4を培養することにより産生される。FLOD-Sは、グルコースとリジン及び／又はN^o-Z-リジンを共にオートクレーブして得られるGL褐変培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び／又はN^o-Z-リジンを別々にオートクレーブ処理して調製した培地では誘導されないことから、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するものである。また、FLOD-Sはリジン、アルギニンを用いたときに高い誘導が見られ、グリシンとリジンを比較すると、リジンを用いた場合により誘導効果が高いことから、フルクトシルリジンにより高い基質活性を有するものである。

【0017】2. 反応特異性及び基質特異性

FLOD-Sは、式：



(式中、R¹はアルドース残基、R²はタンパク残基を表す)で示される反応における触媒活性を有する。上記の反応式において、R¹が-OH、-(CH₂)_n、又は-[CH(OH)]_n-CH₂OH (式中、nは0～6の整数)であり、R²が-CHR³-[CONHR³]_mCOOH (式中、R³は α -アミノ酸側鎖残基、mは1～480の整数を表す)で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、R³がリジン、ポリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、またnが5～6、mが55以下である化合物が好ましい。

【0018】FLOD-Sは、部分精製酵素及び精製酵素のいずれも、FZLに対して高い特異性を示した。部分精製酵素は、GL褐変培地で菌株を24時間培養した後、吸引ろ過して菌糸体を集め、洗浄後、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH 8.5)に懸濁し、ダイノミルにて菌糸体を破砕し、遠心分離した上清を硫酸分画、DEAEセファセルイオン交換クロマトグラフィーで精製することにより調製した。また、精製酵素は、後述する実施例1記載の方法に準じて調製した。結果を下記の表1及び2に示す。

表1 部分精製されたS-1F4由来のFLOD-Sの基質特異性

【表1】

基質	濃度	活性 (U/ml)	比活性 (%)
フルクトシルN ^α -Z-リジン	1.67mM	3.21	100
N ^α -Z-リジン	1.67	N.D. ¹⁾	-
L-リジン	1.67	N.D.	-
D-グルコース	1.67	N.D.	-
D-フルクトース	1.67	N.D.	-
フルクトシルポリ-L-リジン	0.018%	0.0738	2.3
ポリ-L-リジン	0.018	N.D.	-
フルクトシルBSA	0.83	N.D.	-
BSA	0.83	N.D.	-

1): 検出されず

【0019】表2 精製されたS-1F4由来のFLOD-Sの基質特異性

【表2】

基質	濃度	比活性 (%)
フルクトシル N ^α -Z-リジン	1.67mM	100
フルクトシルバリン	1.67	N.D. ¹⁾
N ^α -メチル-L-リジン	1.67	N.D.
フルクトシルポリ-L-リジン	0.02%	2.3

1): 検出されず

表1及び2から、本発明のFLOD-Sは、フルクトシル N^α-Z-リジン (FZL) に対してより高い活性を有すると共に、フルクトシルポリリジンに対しても活性があり、コリネバクテリウム属又はアスペルギルス属由来の既知のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとは基質特異性が異なることが分かる。

【0020】3. pH及び温度の条件

pH条件の測定

0.1M酢酸、リン酸カリウム (K-P)、Tris-HCl及びグリシン (Gly) -NaOH緩衝液 (pH4.0~12.0) にFLOD-Sを加え、30℃、10分間インキュベートした後、通常の条件 (30℃、pH8.0) で活性を測定した。

温度条件の測定

0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH8.0) 中で25~60℃の温度条件にFLOD-Sを加え、10分間インキュベートした後、通常の条件で活性を測定した。上記方法で測定したとき、S-1F4由来のFLOD-Sの安定なpH域は、pH4.0~12.0、好ましくはpH7.0~8.5であり、至適pHは7.0~9.0、好ましくは7.5~8.5、最も好ましくは8.0である (図3

参照)。また、S-1F4由来のFLOD-Sの安定な温度領域は20~55℃であり、30℃以上で徐々に失活し、60℃以上で完全に失活する。また、酵素反応は30~50℃、好ましくは40~50℃、より好ましくは45℃で効率良く進行する (図4参照)。

【0021】4. 力価の測定

酵素の力価測定は下記の方法で行った。

(1) 生成する過酸化水素を比色法により測定する方法。

A. 速度法

50mM FZL溶液はあらかじめ調製したFZLを蒸留水に溶解することによって調製した。45mM 4-アミノアンチピリン、60ユニット/mlパーオキシダーゼ溶液、及び60mM フェノール溶液それぞれ100μlと、0.1MTris-HCl緩衝液 (pH8.0) 1ml、及び酵素溶液50μlを混合し、全量を蒸留水で2.9mlとする。30℃で平衡化した後、50mM FZL溶液100μlを添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数 ($5.16 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位 (ユニット: U) とする。

【0022】B. 終末法

上記A法と同様に処理し、基質添加後、30分間、30℃でインキュベートした後の505nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成しておいた検量線から、生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

(2) 酵素反応による酸素吸収を測定する方法

0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH8.0) 1mlと酵素溶液50μlを混合し、蒸留水で全量を2.9mlとし、ラングブラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。30℃で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、50mM FZL 100μlを添加し、酸素吸収を記録計で連続的

に計測し、初速度を得る。標準曲線から1分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とした。

【0023】5. 酵素の阻害、活性化及び安定化

(1) 金属の影響

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)の条件で、終濃度1mMの各種金属イオンを添加し、5分間、30℃でプレインキュベートした後、活性を測定した。結果を下記の表3に示す。

表3 金属イオンのS-1F4由来FLOD-S活性への影響

【表3】

原料 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100
LiCl	100
KCl	104
NaCl	107
RbCl	103
CsCl ₂	102
MgCl ₂	75
CaCl ₂	77
MnCl ₂	154
FeSO ₄	97
CoSO ₄	42
CuCl ₂	0
ZnSO ₄	0
AgNO ₃	0
BaCl ₂	60
HgCl ₂	0
FeCl ₃	67

表3から明らかに、FLOD-Sの活性は、二価の金属イオンによって若干阻害され、銀イオン、水銀イオン、銅イオン、及び亜鉛イオンにより、完全に阻害される。

【0024】(2) 各種阻害物質の影響

上記(1)の金属イオンの影響に関する試験と同様の方法で試験した。但し、PCMB(パラクロロ安息香酸第二水銀)は終濃度0.1mM、それ以外は1mMとした。結果を下記の表4に示す。また、安定化の検討は、50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.5)に2mMジチオスレイトール(DTT)を添加したものに対して一晩透析を行った後、活性を測定することにより行った。結果を下記の表4に示す。

表4 各種物質のS-1F4由来FLOD-S活性への影響

【表4】

試薬 (1 mM)	比活性 (%)
なし	100
パラクロ安息香酸第二水銀*	0
5,5'-チオビス(2-ニトロフェニル)	95
ヨード酢酸	102
アジ化ナトリウム	101
α, α' -ジピリジル	106
O-フェナンスロレン	103
セミカルバジド	103
フェニルヒドラジン	2.6
ヒドラジン	13
ヒドロキシルアミン	21
クロルギニン	132
デブレニル	102
アミノグアニジン	66

*: 0.1mM

表4から明らかに、FLOD-S活性はPCMB(パラクロロ安息香酸第二水銀)により、完全に阻害される。また、フェニルヒドラジン、ヒドラジンによっても阻害される。これら阻害物質の影響は、酵素活性の発現にSH基、カルボニル基が関与していることを示唆している。他方、ジチオスレイトールによって安定化され、保存に適した溶媒はジチオスレイトール(DTT)2mMを添加した50mM Tris-HCl緩衝液(pH8.5)である。

【0025】6. 分子量

分子量はセファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法、及びSDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動)で測定した。カラムクロマトグラフィは0.1M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.5)を用いて行った。分子量既知の数種のタンパクについても同様に行い、溶出位置から本酵素の分子量を求めた。SDS-PAGEはデビスの方法に従い、10%ゲルを用いて、40mAで、3時間泳動し、タンパク染色は、クマシーブリリアントブルーG-250で行った。標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン、オボアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、大豆トリプシンインヒビターについても同様に泳動し、検量線から、分子量を求めた。測定の結果、S-1F4由来のFLOD-Sは、セファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法で測定した場合、分子量約45,000(45kDa)であり、SDS-PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリ

15

16

ルアミドゲル電気泳動)で測定した場合、約50,000(50kDa)であった(図5,6参照)。

【0026】7.等電点

ディスク焦点電気泳動法によって測定した結果、S-1 F4由来のFLOD-Sの場合、 $pI=4.8$ であった。

*【0027】8.既知の酵素との比較

既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本発明のS-1 F4由来FLOD-Sとを比較した。

表5 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表5】

	フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ S-1 F4	コリネバクテリウム sp. ¹⁾	アスペルギルス sp. ²⁾
分子量(kDa)	45,000	88,000	83,000
分子量(SDS-PAGE)	50,000	44,000	43,000
補酵素	共有結合したFAD	非共有結合的に結合したFAD	非共有結合的に結合したFAD
フルクトシルリジン特異性	48.9 ³⁾	N.D. ⁴⁾	11.28 ⁴⁾
フルクトシルバリン特異性	N.D.	7.09	59.8
(U/mg タンパク)			
ミハエリス定数	0.22mM	0.74mM	2.2mM
	(フルクトシルリジンについて)	(フルクトシルグリシンについて)	(フルクトシルグリシンについて)
至適pH	8.0	8.3	7.7
SH試薬による不活化	あり	なし	あり
至適温度(℃)	45	40	40
等電点	4.8	4.6	6.8

1): ホリウチら (T.Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110(1989)

2): ホリウチら (T.Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338(1991)

3): フルクトシル-N^o-Z-リジンに対する比活性

4): N^o-フルクトシル-N^o-ホルミルリジンに対する比活性

表5から、本発明のFLOD-Sと他の2種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違: 本発明のFLOD-Sが菌体内で、単量体として産生されているのに対し、他の2種の酵素は、菌体内で2量体として産生されている

(2) 補酵素: FLOD-Sは補酵素として共有結合的に結合したFADを有するのに対し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合したFADを有する。

(3) 基質特異性: 基質であるフルクトシルリジンに対する特異性の相違を示している。即ち、FLOD-Sはフルクトシルリジンに対して高い特異性を有する。一方、コリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、フルクトシルバリンに対する活性に比べて、その活性が低い。

(4) ミハエリス定数: FLOD-Sの基質FZLに対する親和性は、他の酵素のそれよりも高いことを示している。

(5) 至適pH、至適温度、等電点、及びSH試薬によ

る阻害: FLOD-Sと他の2酵素との相違を示している。

【0028】(II) ギベレラ属によって産生されるFLOD類

該FLOD-G類は一般に、下記の理化学的特性を有する。

30 1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し;

2) 至適pHは8.0であり;

3) 安定温度は20~50℃、至適温度は35℃であり;

4) スーパーデックス200pgを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約47,000(47kDa)である。

【0029】該FLOD-Gの特性を詳細に説明する。

40 1. 一般的な誘導特性

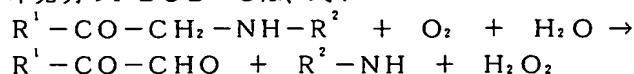
FLOD-Gはフルクトシルリジン及び/又はフルクトシル-N^o-Z-リジン(FZL)によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び/又はFZLを窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び/又はFZL含有培地で、ギベレラ属のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生性菌株を培養することにより産生される。FLOD-Gは、グルコースとリジン及び/又はN^o-Z-リジンを共にオートクレーブして得られるGL褐変培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び/又はN^o-Z-リジンを別々にオートク

17

レーブ処理して調製した培地では誘導されないことから、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するものである。

【0030】2. 反応特異性及び基質特異性

本発明のFLOD-Gは、式：



(式中、 R^1 はアルドース残基、 R^2 はタンパク残基を表す)で示される反応における触媒活性を有する。上記の反応式において、 R^1 が $-OH$ 、 $-(CH_2)_n-$ 、又は $-[CH(OH)]_n-CH_2OH$ (式中、 n は0-6の整数)であり、 R^2 が $-CHR^3-[CONHR^3]_m.CO*$

18

*OH (式中、 R^3 は α -アミノ酸側鎖残基、 m は1-480の整数を表す)で示されるアマドリ化合物が基質として好ましい。中でも、 R^3 がリジン、ポリリジン、バリン、アスパラギンなどから選択されるアミノ酸の側鎖残基であり、また n が5-6、 m が5以下である化合物が好ましい。

【0031】本発明のFLOD-Gは、以下の表6に示すように、フルクトシル N^{α} -Z-リジンに対して高い特異性を有する。

表6 精製されたG. フジクロイ (IFO NO. 6356) 由来のFLOD-Gの基質特異性

【表6】

基質	濃度	比活性(%)
N^{α} -フルクトシル N^{α} -Z-リジン	1.67mM	100
フルクトシルバリン	1.67	N. D.* ¹
N^{α} -メチル-L-リジン	1.67	N. D.
N^{α} -フルクトシルポリ-L-リジン	0.02%	1.0
ポリ-L-リジン	0.02	N. D.
FBSA* ²	0.17	N. D.
FHSA* ³	0.17	N. D.
トリブチックFBSA	0.17	0.19
トリブチックFHSA	0.17	N. D.
トリブチック N^{α} -フルクトシルポリ-L-リジン	0.17	59.7

*1: 検出されず

*2: フルクトシル牛血清アルブミン

*3: フルクトシルヒト血清アルブミン

表6から、本発明のFLOD-Gはフルクトシルポリリジンに対する活性を有し、糖化タンパクのプロテアーゼ消化物に対する活性もある。

3. pH及び温度の条件

(1)の3と同様にpH条件の測定を行った結果、至適pHは8.0である(図7)。また、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)中で20~60℃の温度条件にFLOD-Gを加え、10分インキュベートした後、通常の条件で活性を測定した。上記方法で測定したとき、本発明のFLOD-Gの安定な温度領域は20~50℃、好ましくは20~40℃、より好ましくは20℃であり、酵素反応は、20~50℃、好ましくは20~40℃、より好ましくは35℃で効率良く進行する(図8)。

【0032】4. 力価の測定

酵素の力価測定は下記の方法で行った。

(1)生成する過酸化水素を比色法により測定する方法。

A. 速度法

100mM FZL溶液はあらかじめ得られたFZLを

蒸留水で溶解することによって調製した。45mM 4-アミノアンチピリン、60ユニット/mlパーオキシダーゼ溶液、及び60mM フェノール溶液それぞれ100 μ lと、0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)1ml、及び酵素溶液50 μ lを混合し、全量を蒸留水で2.95mlとする。30℃で平衡化した後、100mM FZL溶液50 μ lを添加し、505nmにおける吸光度を経時的に測定した。生成するキノン色素の分子吸光係数($5.16 \times 10^3 M^{-1} cm^{-1}$)から、1分間に生成する過酸化水素のマイクロモルを算出し、この数字を酵素活性単位(ユニット:U)とする。

【0033】B. 終末法

上記A法と同様に処理し、基質添加後、30分間30℃でインキュベートした後の505nmにおける吸光度を測定し、あらかじめ標準過酸化水素溶液を用いて作成しておいた検量線から、生成した過酸化水素量を算出することにより、酵素活性を測定する。

(2) 酵素反応による酸素吸収を測定する方法

0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.0)1mlと酵素溶液50 μ lを混合し、蒸留水で全量を3.0mlとし、ラングブラザーズ社の酸素電極のセルに入れる。30℃で攪拌し、溶存酸素と温度を平衡化した後、50mM FZL 100 μ lを添加し、酸素吸収を記録計で連続的

に計測し、初速度を得る。標準曲線から1分間に吸収された酸素量を求め、これを酵素単位とした。

【0034】5. 酵素の阻害、活性化及び安定化

(1) 金属の影響

0.1M Tris-HCl緩衝液 (pH 8.0) の条件で、終濃度1mMの各、金属イオンを添加し、5分間30℃でプレインキュベートした後、活性を測定した。結果を下記の表7に示す。

表7 金属イオンの、G. フジクロイ (IFO NO. 6356) 由来FLOD-Gの活性への影響

【表7】

原料(1mM)	比活性(%)	原料(1mM)	比活性(%)
なし	100	FeSO ₄	74
LiCl	96	CoSO ₄	15
KCl	98	CuCl ₂	2
NaCl	97	ZnSO ₄	33
RbCl	97	AgNO ₃	0
CsCl	97	BaCl ₂	103
MgCl ₂	94	HgCl ₂	25
CaCl ₂	97	FeCl ₃	16
MnCl ₂	115		

*

試薬(1mM)	比活性(%)	試薬(1mM)	比活性(%)
なし	100	セミカルバジド	77
パラクロロ安息香酸第二水銀*	51	フェニルヒドラジン	13
5,5'-ジチオビス(2-ニトロ安息香酸)	76	ヒドラジン	14
ヨード酢酸	77	ヒドロキシルアミン	16
アジ化ナトリウム	78	デブレニル	81
α, α'-ジピリジル	78	アミノグアニジン	50
o-フェナンスロリン	78	EDTA	81

*1: 0.1mM

表8から明らかに、FLOD-G活性はパラクロロ安息香酸第二水銀、ヒドラジン、フェニルヒドラジン、ヒドロキシルアミン及びアミノグアニンにより、強く阻害され、酵素反応にはSH基及びカルボニル基が重要な働きをしていることが予想される。他方、ジチオスレイトールによって安定化され、保存に適した溶媒はジチオスレイトール2mMを添加した50mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) である。

【0036】6. 分子量

スーパーデックス200pgによるゲルろ過法で求めた結果、分子量は約47,000 (47kDa) であった

*表7から明らかに、本発明のFLOD-Gの活性に対し、コバルトイオン、銅イオン、亜鉛イオン、水銀イオン及び鉄(III)イオンが阻害的であり、銀イオンは完全に阻害する。

【0035】(2) 各種阻害物質の影響

上記(1)の金属イオンの影響に関する試験と同様の方法で試験した。結果を表8に示す。安定化の検討は、50mM Tris-HCl緩衝液 (pH 8.5) に2mMジチオスレイトール (DTT) を添加したものに対して一晩透析を行った後、活性を測定することにより行った。

表8 各種物質のFLOD-G活性への影響

【表8】

(図9)。また、SDS-PAGE (ドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動) は、(I) の6と同様の方法で行い、分子量を求めた結果、分子量は約52,000 (52kDa) であることが示された (図10)。従って、本発明のFLOD-Gは単量体であることが明らかである。

【0037】7. 既知の酵素との比較

既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本発明のFLOD-Gとを比較した。

表9 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表9】

21		22	
産生菌	ギベレラ・フジクロイ IFO 6356	コリネバクテリウム sp. 11	アスペルギルス sp. 21
分子量 ($\times 10^{-3}$ 左右) (SDS-PAGE)	47,000 52,000	88,000 44,000	83,000 43,000
補酵素	FADと共有結合	FADと非共有結合	FADと非共有結合
基質特異性(U/mg・タンパク) (フルクトシルグリシン) (フルクトシルアミン)	48.3 ³¹ N.D.	N.D. ⁴¹ 7.09	11.28 ⁴¹ 59.8
ミハリス定数	0.13mM (FZLについて)	0.74mM (フルクトシルグリシンについて)	2.2mM (フルクトシルグリシンについて)
至適pH	8.0	8.3	7.7
至適温度(°C)	35	40	40
SH試薬による 影響	あり	なし	あり

1): ホリウチら (T.Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110 (1989)

2): ホリウチら (T.Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338 (1991)

3): フルクトシル N^o -Z-リジンに対する比活性

4): N- α -フルクトシル N^o -ホルミルリジンに対する比活性

表 9 から、本発明の FLOD-G と他の 2 種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違: 本発明の FLOD-G は、単量体として産生されているのに対し、他の 2 種の酵素は二量体として産生されている。

(2) 補酵素: FLOD-G は補酵素として共有結合的に結合した FAD を有するのに対し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合した FAD を有する。

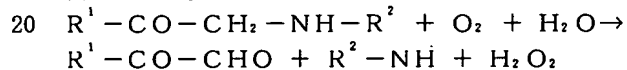
(3) 基質特異性: FLOD-G は、フルクトシルバリンには作用せず、フルクトシルリジンに特異的であるが、コリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、フルクトシルバリンに対する活性に比べて、その活性が低い。

(4) ミハリス定数: FLOD-G の基質フルクトシルリジンに対する親和性が、他の酵素のそれよりも高いことを示している。

(5) 至適 pH、至適温度、及び SH 試薬による阻害等の差異は FLOD-G と他の 2 酵素との相違を示している。

【0038】 既述のごとく、フサリウム属及びギベレラ属由来の菌により、本発明方法に従って産生された FLOD は、アマドリ化合物の定量に有用である。従って、本発明はまた、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明の FLOD とを接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法を提供するものである。本発明の分

析法は、生体成分中の、糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量に基づいて行われる。FLOD の酵素活性は下記の反応に基づいて測定される。



(式中、R¹ はアルドース残基、R² はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す)

被検液としては、アマドリ化合物を含有する任意の試料溶液を用いることができ、例えば、血液(全血、血漿又は血清)、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。

【0039】 本発明の FLOD をアマドリ化合物含有溶液に、適当な緩衝液中で作用させる。反応溶液の pH 及び温度は、それぞれ、使用する酵素に適した条件とする。即ち、FLOD-S の場合、pH 4.0~12.0、好ましくは pH 8.0、温度 20~55℃、好ましくは 30~45℃、より好ましくは 45℃で行う。また、FLOD-G の場合、pH 4.0~12.0、好ましくは 8.0、温度は 20~50℃、好ましくは 35℃である。FLOD の使用量は、終点分析法においては通常、0.1 ユニット/ml 以上、好ましくは 1~100 ユニット/ml である。緩衝液としては Tris-HCl 等を用いる。

【0040】 本発明の分析法では、下記のいずれかのアマドリ化合物の定量法を用いる。

(1) 過酸化水素発生量に基づく方法

当該技術分野で既知の過酸化水素の定量法、例えば、発色法、過酸化水素電極を用いる方法等で測定し、過酸化水素及びアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記 (I)、4 又は (II)、4 に記載の力価測定法に準じる。ただし、FLOD 量は 1 ユニット/ml とし適当に希釈した試料を添加し、生成する過酸化水素量を測定する。過酸化水素発色系としては、4

ーアミノアンチピリン／フェノール系のかわりに4ーアミノアンチピリン／NーエチルーNー（2ーヒドロキシー3ースルホプロピル）ーmートルイジン、4ーアミノアンチピリン／N,Nージメチルアニリン、4ーアミノアンチピリン／N,Nージエチルアニリン、MBTH／N,Nージメチルアニリン、4ーアミノアンチピリン／2,4ージクロロフェノール等の組み合わせが可能である。

（2）酵素の消費量に基づく方法

反応開始時の酸素量から反応終了時の酸素量を差し引いた値（酸素消費量）を測定し、酸素消費量とアマドリ化合物の量に関して作成した標準曲線と比較することにより、試料中のアマドリ化合物を定量する。具体的には、上記（I）、4又は（II）、4の力価の測定に準じて行う。但し用いるFLOD量は1ユニット／mlとし、適当に希釈した試料を添加し吸収される酸素量を求める。

【0041】本発明方法は試料溶液をそのまま用いて行うこともできるが、対象となる糖化タンパクによっては、あらかじめ糖が結合したリジン残基を遊離させてから行うことが好ましい。そのような目的には、タンパク質分解酵素を用いる場合（酵素法）と、塩酸等の化学物質を用いる場合（化学法）があるが、前者が好ましい。本発明方法に用いることができるタンパク質分解酵素は、当業者に既知であり、トリプシン、カルボキシペプチダーゼB、パパイン、アミノペプチダーゼ、キモトリプシン、サーモリシン、ズブシリシン、プロティナーゼK、プロナーゼ等を挙げることができる。酵素処理の方法も既知であり、例えばトリプシン処理は、下記実施例に記載の方法で行うことができる。

【0042】上記のごとく、本発明のFLODは、糖化タンパクに含まれるフルクトシルリジンに高い基質特異性を有するものであることから、血液試料中の糖化タンパクを測定することを含む、糖尿病の診断などに有用である。このように、検体として血液試料（全血、血漿又は血清）を用いる場合、採血した試料をそのまま、あるいは透析等の処理をした後、用いる。さらに、本発明方法に用いるFLOD、パーオキシダーゼ等の酵素は、溶液状態で用いてもよいが、適当な固体支持体に固定化してもよい。例えば、ビーズに固定化した酵素をカラムに充填し、自動化装置に組み込むことにより、臨床検査など、多数の検体の日常的な分析を効率的に行うことができる。しかも、固定化酵素は再使用が可能であることから、経済効率の点でも好ましい。さらには、酵素と発色色素とを適宜組み合わせ、臨床分析のみならず、食品分析にも有用なアマドリ化合物の分析のためのキットを得ることができる。

【0043】酵素の固定化は当該技術分野で既知の方法により行うことができる。例えば、担体結合法、架橋化法、包括法、複合法等によって行う。担体としては、高

分子ゲル、マイクロカプセル、アガロース、アルギン酸、カラギーナン、などがある。結合は共有結合、イオン結合、物理吸着法、生化学的親和力を利用し、当業者既知の方法で行う。固定化酵素を用いる場合、分析はフロー又はバッチ方式のいずれでもよい。上記のごとく、固定化酵素は、血液試料中の糖化タンパクの日常的な分析（臨床検査）に特に有用である。臨床検査が糖尿病診断を目的とする場合、診断の基準としては、結果を糖化タンパク濃度として表すか、試料中の全タンパク質濃度に対する糖化タンパク質の濃度の比率（糖化率）又はフルクトサミン値で表される。全タンパク質濃度は、通常の方法（280nmの吸光度、Lowry法あるいは、アルブミンの自然蛍光など）で測定することができる。

【0044】本発明はまた本発明のFLODを含有するアマドリ化合物の分析試薬又はキットを提供するものである。本発明のアマドリ化合物の定量のための試薬は、本発明のFLOD、好ましくはpH7.5～8.5、より好ましくはpH8.0の緩衝液からなる。該FLODが固定化されている場合、固体支持体は高分子ゲルなどから選択され、好ましくはアルギン酸である。試薬中のFLODの量は、終点分析を行う場合、試料あたり、通常1～100ユニット／ml、緩衝液はTris-HCl（pH8.0）が好ましい。過酸化水素の生成量に基づいてアマドリ化合物を定量する場合、発色系としては、上記と同様、4ーアミノアンチピリン／フェノール系のかわりに4ーアミノアンチピリン／NーエチルーNー（2ーヒドロキシー3ースルホプロピル）ーmートルイジン、4ーアミノアンチピリン／N,Nージメチルアニリン、4ーアミノアンチピリン／N,Nージエチルアニリン、MBTH／N,Nージメチルアニリン、4ーアミノアンチピリン／2,4ージクロロフェノール等の組み合わせが可能である。本発明のアマドリ化合物の分析試薬と、適当な発色剤並びに比較のための色基準あるいは標準物質を組み合わせ、予備的な診断、検査に有用なキットすることができる。上記の分析試薬およびキットは、生体成分中の、糖化タンパクの量及び／又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンを定量するために用いられるものである。以下に実施例を挙げて本発明をさらに詳しく説明する。

【0045】

【実施例】

実施例1 F.オキシスポルムS-1F4由来のFLOD-Sの製造及び精製

F.オキシスポルムS-1F4 (*Fusarium oxysporum* S-1F4:FERMBP-5010)をFZL0.5%、グルコース1.0%、リン酸二カリウム0.1%、リン酸一ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム0.05%、塩化カルシウム0.01%、イーストエキス0.2%を含有する培地（pH6.0）10Lに植菌し、ジャーファーマンターを用いて通気量2L／分、攪拌速度400rpmの条件で2

8℃、24時間攪拌培養した。培養物はろ過して集めた。菌糸体の一部(200g)を、2mMのDTTを含む、0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液(pH8.5)1Lに懸濁し、ダイノミルにより菌糸体を破碎した。破碎液を10,000rpmで15分間遠心分離し、得られた液を粗酵素液(無細胞抽出液)とした。粗酵素液に40%飽和になるように硫酸アンモニウム(以下、硫酸と略す)を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。得られた上清に75%飽和になるように硫酸を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。沈殿を2mMのDTTを含有する50mM Tris-HCl塩酸緩衝液(pH8.5)(以下、緩衝液Aと略す)に溶解し、緩衝液Aにて一晚透析した。透析物を緩衝液Aにて平衡化したDEAE-セファセルカラムに吸着した。同緩衝液Aにて洗浄した後、0-0.5Mの塩化カリウム直線濃度勾配で溶出した。活性画分を集め、55%から75%の硫酸分画に供し、緩衝液Aにて一晚透析した。透析物に25%飽和になるように硫酸を加え、25%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したフェニールトヨパールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度25-0%飽和の直線勾配で溶出した。活性画分を集め、40%飽和になるように硫酸を添加し、40%飽和硫酸を含む緩衝液Aで平衡化したブチールトヨパールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫酸濃度40-0%飽和の直線濃度勾配にて溶出した。活性画分を集め、80%飽和となるように硫酸を添加し、攪拌後、12,000rpm、10分間遠心分離し、得られた沈殿を0.1Mの緩衝液Aに溶解した。その酵素溶液を0.1M塩化カリウムを含有する、0.1M緩衝液Aで平衡化したセファクリルS-200ゲルろ過クロマトグラフィに供した。活性画分を集め、限外濾過で濃縮した。濃縮物をファルマシアFPLCシステムでMono Qカラムを用いて処理すること(緩衝液Aを用いた塩化カリウムの0-0.5M直線濃度勾配による溶出)により、30~60ユニットの精製酵素を得た。

【0046】精製酵素のUV吸収スペクトルを図11に示す。図11は、本酵素がフラビン酵素であることを示唆している。また、該精製酵素標品を用いて、セファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法、及びドデシル硫酸ナトリウム・ポリアクリルアミドゲル電気泳動(以下、SDS-PAGEと称する)で分子量を測定した。カラムクロマトグラフィは0.1M NaCl含有0.1M Tris-HCl緩衝液(pH8.5)を用いて行った。分子量既知の数種のタンパクについても同様に行い、溶出位置から本酵素の分子量を求めた。SDS-PAGEは標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、大豆トリプシンインヒビターを用い、デービスの方法に従って分子量を測定した。即ち、10%ゲルを用いて、40mAで、3時間泳動し、タンパク

染色は、クマシーブリリアントブルーG-250で行った。検量線から、分子量を求めた。測定の結果、S-1F4由来のFLOD-Sは、セファクリルS-200を用いるカラムゲルろ過法で測定した場合、分子量約45,000(45kDa)であり、SDS-PAGEで測定した場合、約50,000(50kDa)であった(図5、6参照)。さらに、本実施例で調製したFLOD-Sの酵素活性、pH及び温度安定性、金属及び阻害物質による影響などに関しては、前記(1)の各項に記載の値又は性質を示した。

【0047】リジン残基にグルコースが結合している[J. Biol. Chem. 26: 13542-13545(1986)]糖化ヒト血清アルブミン(glycated human serum albumin; シグマ社)を糖化タンパク基質として用い、上記実施例で調製した精製FLOD-Sを用いて定量した。

実施例2 糖化アルブミン濃度の定量

1) トリプシン処理

試薬の調製

A: 2%トリプシン溶液[0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液(pH8.0)に溶解]
B: 45 mM 4-アミノアンチピリン水溶液
C: 60 mM N-エチル-N-(2-ヒドロキシ-3-スルホプロピル)-m-トルイジン
D: 60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液
E: 14ユニット/ml FLOD-S
Eの14ユニット/ml FLOD-S液は以下の方法で調製した。即ち、実施例1で得たE. オキシスポルムS-1F4由来の精製FLOD-Sを14ユニット/mlになるように蒸留水で希釈した。FLOD反応液は0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液(pH 8.0)10mlにB~E液それぞれ1ml加え、蒸留水にて全量を30mlとすることにより調製した。トリプシン処理は、種々の濃度(0-1.0%)の糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)30μlと同量のA液とを混合し、37℃、60分間インキュベートすることにより行った。

【0048】2) 定量

トリプシン処理した反応液にFLOD反応液1ml加え、30℃、30分間インキュベートした後、555nmにおける吸光度を測定した。結果を図12に示す。図中、縦軸は555nmの吸光度(過酸化水素量に対応)、横軸は糖化アルブミンの濃度を表す。図は、糖化アルブミン濃度と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0049】実施例3 ヒト血清アルブミンの糖化率の測定

0.9%塩化ナトリウム水溶液3mlに、糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mg、ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mgをそれぞれ溶解した。これらの溶液を混合することにより、糖化率の異なる溶液を作成し、自動グリコアルブミン測定装置(京都第一科学)を

用いて検定したところ、その糖化率は、24.1%~5 *を次のように調製した。

1.9%であった。これらの溶液を用いて前処理混合物 *

糖化アルブミン溶液	190 μ l
6mg/ml プロテイナーゼK (シグマ社)	20 μ l
6mg/ml プロナーゼE (シグマ社)	20 μ l
1.25% SDS	20 μ l

これらの混合物を55℃で30分間インキュベートし ※ように調製された反応液に加えた。

た。その後、各前処理試料から1部を取り出し、以下の※

45mM 4-アミノアンチピリン溶液	70 μ l
60mM フェノール溶液	70 μ l
60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	70 μ l
0.1M Tris-HCl 塩酸緩衝液 (pH 8.0)	700 μ l
11.5ユニット/ml FLOD-S溶液	30 μ l

蒸留水で全量を2mlとした。11.5ユニット/ml FLOD-S溶液は、実施例1の方法で得たFLOD-Sを11.5ユニット/mlになるよう、0.1M Tris-HCl 塩酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈して調製した。この反応液を30℃でインキュベートし、各処理試料を100 μ l加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるアルブミンの糖化率と吸光度との関係を図13に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度 (過酸化水素の量に対応)、横軸はアルブミンの糖化率を表す。図は、アルブミンの糖化率と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0050】実施例4 血液試料中の糖化タンパクの定量

糖尿病患者血清を基質として用い、実施例1で精製したFLOD-Sを用いて血中糖化タンパクを実施例2の方法で定量した。従来、糖尿病患者の血糖管理指標としては血清中のフルクトサミンや全血中のヘモグロビンA1c (HbA1c) 値が用いられている。本実施例では、外来糖尿病患者の血液試料を用いて、本発明のFLOD-Sを用いた酵素法による糖化タンパク (血清アルブミン) 測定と、従来から用いられている指標との相関の程度を検討した。結果を図14、15に示す。図中の縦軸は555nmの吸光度 (過酸化水素量に対応)、横軸は試料とした患者血清中のフルクトサミン値 (図14)、全血中のヘモグロビンA1c値 (図15) を示す。それぞれの図はFLOD-Sを用いた糖化タンパクの測定結果と従来の糖尿病患者の血糖管理指標との間に相関関係があることを示している。即ち、本発明方法の指標としての有用性が確認された。また、HbA1c、フルクトサミン値の高い患者は糖化タンパク (血清アルブミン) 値も高くなるはずである。フルクトサミンは血清中のタンパクが糖化されたものであるため、その主成分であるアルブミンの生体内での寿命とよく相関する。しかし、HbA1cは、ヘモグロビンとアルブミンの生体内での寿命が異なり、また糖化部位がバリン残基であることから、糖化タンパクとの相関は、フルクトサミンと糖化タンパクとの相関よりも劣ると予想される。図14及び1

5から、このことを読み取ることができる。

【0051】実施例5 G. フジクロイ (IFO NO. 6356) 由来のFLOD-Gの製造及び精製
G. フジクロイ (IFO NO. 6356; *Gibberella fujikuroi*) をFZL0.5%、グルコース 1.0%、リン酸二カリウム0.1%、リン酸一ナトリウム0.1%、硫酸マグネシウム 0.05%、塩化カルシウム 0.01%、イーストエキス 0.2%を含有した培地 (pH 6.0) 10Lに植菌し、ジャーファーマンターを用いて通気量2L/分、攪拌速度400rpmの条件で28℃、24時間攪拌培養した。培養物は濾過して集めた。菌糸体170g (湿重量) を、2mMのDTTを含む、0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) 1Lに懸濁し、ダイノミルにより菌糸体を破碎した。破碎液を10,000rpmで15分間遠心分離し得られた液を粗酵素液 (無細胞抽出液) とした。粗酵素液に40%飽和になるように硫安を加え、攪拌し12,000rpmで10分間遠心分離した。得られた上清に75%飽和になるように硫安を加え、攪拌し、12,000rpmで10分間遠心分離した。沈殿を2mMのDTTを含有する50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.5) (緩衝液A) に溶解し、緩衝液Aにて一晚透析した。透析物を緩衝液Aにて平衡化したDEAE-セファセルカラムに吸着した。緩衝液Aにて洗浄した後、0-0.5Mの塩化カリウム直線濃度勾配で溶出した。活性画分を集め、55%から75%の硫安分画に供し、緩衝液Aにて一晚透析した。透析物に25%飽和になるように硫安を加え、25%飽和硫安を含む緩衝液Aで平衡化したフェニルルートヨパールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫安濃度25-0%飽和の直線勾配で溶出した。活性画分を集め、40%飽和になるように硫安を添加し、40%飽和硫安を含む緩衝液Aで平衡化したブチルルートヨパールカラムに吸着した。同緩衝液にて洗浄した後、硫安濃度40-0%飽和の直線濃度勾配にて溶出した。活性画分を集め、80%飽和となるように硫安を添加し、攪拌後、12,000rpm、10分間遠心分離し、得られた沈殿を0.1M塩化カ

リウムを含有する、0.1M緩衝液Aで平衡化したセファクリルS-200ゲル濾過クロマトグラフィーに供した。活性画分を集め、限外濾過で濃縮した。濃縮物をファルマシアFPLCシステムでMono Qカラムを用いて処理すること（緩衝液Aを用いた塩化カリウムの0.5M直線濃度勾配による溶出）により、30~60ユニットの精製酵素を得た。

【0052】得られた精製酵素標品をSDS-PAGEにおいて、標準タンパクとしてホスホリラーゼB、牛血清アルブミン(BSA)、オボアルブミン、カルボニックアンヒドラーゼ、大豆トリプシンインヒビターを用い、デービスの方法に従って分子量を測定した。即ち、10%ゲルを用いて、40mAで3時間泳動し、クマシーブリリアントブルーG-250でタンパク染色を行った。検量線から分子量を求めた結果、サブユニットの分子量は約52,000(52kDa)であることが示された(図10)。また、スーパーデックス200pgに*

45mM	4-アミノアンチピリン溶液	50μl
60mM	フェノール溶液	50μl
60ユニット/ml	パーオキシダーゼ溶液	50μl
0.1M	Tris-HCl緩衝液(pH8.0)	500μl
7.6ユニット/ml	FLOD-G溶液	30μl

蒸留水で全量を1300μlとした。7.6ユニット/ml FLOD-G溶液は、実施例5の方法で得たギベラ由来のFLOD-Gを7.6ユニット/mlになるよう、0.1M Tris-HCl塩酸緩衝液(pH8.0)で希釈して調製した。この反応液を30℃でインキュベートし、各処理試料を200μl加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるフルクトサミンと吸光度との関係を図16に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸はフルクトサミン値を表す。図は、フルクトサミン値と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。 ※

糖化アルブミン溶液	190μl
6mg/ml プロテイナーゼK (シグマ社)	20μl
6mg/ml プロナーゼE (シグマ社)	20μl
1.25% SDS	20μl

これらの混合物を55℃で30分間インキュベートした。その後、各前処理試料から一部をとり出し、以下の★

45mM	4-アミノアンチピリン溶液	70μl
60mM	フェノール溶液	70μl
60ユニット/ml	パーオキシダーゼ溶液	70μl
0.1M	Tris-HCl塩酸緩衝液(pH8.0)	700μl
7.6ユニット/ml	FLOD-G溶液	30μl

蒸留水で全量を2mlとした。この反応液を30℃でインキュベートし、各処理試料を100μl加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるアルブミンの糖化率と吸光度との関係を図17に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度(過酸化水素の量に対応)、横軸はアルブミンの糖化率を表す。図は、アル

*によるゲルろ過による分子量測定では、図9の検量線図から明らかなように、約47,000(47kDa)であった。本実施例で調製したFLOD-Gの酵素活性、pH及び温度安定性、金属及び阻害物質による影響などに関しては、前記(II)の各項に記載の値又は性質を示した。

【0053】**実施例6** フルクトシルポリリジンの定量 0.1%のフルクトシルポリリジン溶液をBMY・NB T検定法を用いて検定したところ、750μmol/lのフルクトサミンを含有することが分かった。この溶液を蒸留水で希釈することにより、0~750μmol/lの範囲で変化する一連の試料を作成した。各希釈液について、同量の0.05%トリプシンと混合し、37℃で1時間インキュベートした。その後、各前処理試料から一部をとり出し、以下のように調製された反応液に加えた。

※【0054】**実施例7** ヒト血清アルブミンの糖化率の測定 0.9%塩化ナトリウム水溶液3mlに、糖化ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mg、ヒト血清アルブミン(シグマ社)150mgをそれぞれ溶解した。これらの溶液を混合することにより、糖化率の異なる溶液を作成し、自動グリコアルブミン測定装置(京都第一科学)を用いて検定したところ、その糖化率は、24.1%~51.9%であった。これらの溶液を用いて前処理混合物を次のように調製した。

★ように調製された反応液に加えた。

ブミンの糖化率と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【0055】

【発明の効果】本発明のFLODは、従来の同種の酵素フルクトシルアミノ酸オキシダーゼとは基質特異性に於いて異なり、フルクトシルリジンに特異的に作用する。

従って、新たな臨床分析及び食品分析法の開発に有用であり、糖尿病の診断や食品の品質管理の面で寄与するところが多い。特に、血中の糖化タンパクの量及び／又は糖化率を指標として、糖尿病の病状の診断に役立つと考えられる。また、本発明のFLODを用いるアマドリ化合物の分析試薬及び分析方法によって、正確に糖化タンパクを定量することができ、糖尿病の診断、症状管理に貢献することができる。さらに、本発明のフルクトシルリジン及び／又はFZL製造方法によりフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養に有用なフルクトシルリジン及び／又はFZLを容易に得ることができる。また、このフルクトシルリジン及び／又はFZLを含有するGL褐色変化培地は、FLOD産生菌の培養を効率良く行う上で有用である。

【図面の簡単な説明】

【図1】 1%のN⁺-Z-リジンをオートクレーブ処理することによるフルクトシルN⁺-Z-リジンの生成量とグルコース濃度との関係を示すグラフ。

【図2】 FLODの培養培地での産生量と培養時間の関係を示すグラフ。

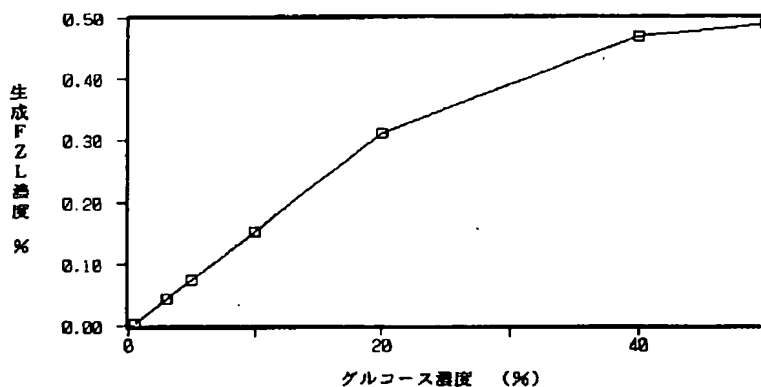
【図3】 S-1F4由来FLOD-Sの溶媒中での活性とpHの関係を示すグラフ。

【図4】 S-1F4由来FLOD-Sの溶媒中での活性と温度の関係を示すグラフ。

【図5】 セファクリルS-200を用いたゲルろ過によるS-1F4由来FLOD-Sの分子量測定の結果を示すグラフ。

【図6】 S-1F4由来精製FLOD-SをSDS-PAGEにかけて得た電気泳動による移動パターンを示す*

【図1】



* 写真の模写図。

【図7】 ギベレラ由来FLOD-Gの溶媒中での活性とpHの関係を示すグラフ。

【図8】 ギベレラ由来FLOD-Gの溶媒中での活性と温度の関係を示すグラフ。

【図9】 ギベレラ由来精製FLOD-Gをスーパーデックス200pgを用いたゲルろ過により分子量測定した結果を示すグラフ。

【図10】 ギベレラ由来精製FLOD-GをSDS-PAGEにかけて得た電気泳動による移動パターンを示す写真の模写図。

【図11】 精製S-1F4由来FLOD-Sの吸収スペクトル。

【図12】 基質として用いた糖化ヒト血清アルブミンの濃度と、FLOD作用により生成された過酸化水素の量との関係を示すグラフ。

【図13】 アルブミンの糖化率と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

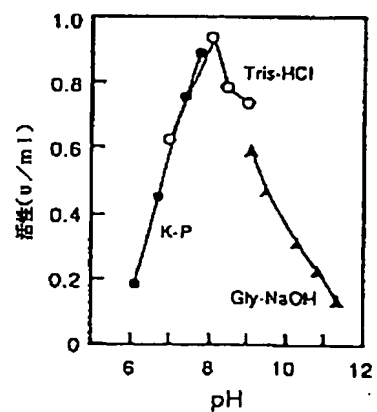
【図14】 糖尿病患者の血清中のフルクトサミン値とFLOD-Sによる糖化タンパク濃度測定値との関係を示すグラフ。

【図15】 糖尿病患者の全血中のヘモグロビンA1c値とFLOD-Sによる糖化タンパク濃度測定値との関係を示すグラフ。

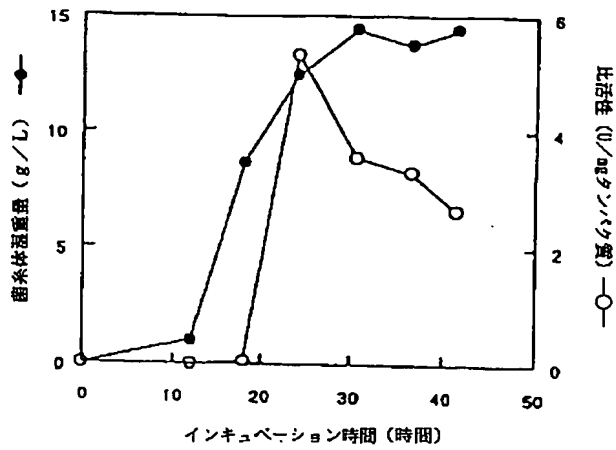
【図16】 フルクトサミン値と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

【図17】 アルブミンの糖化率と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

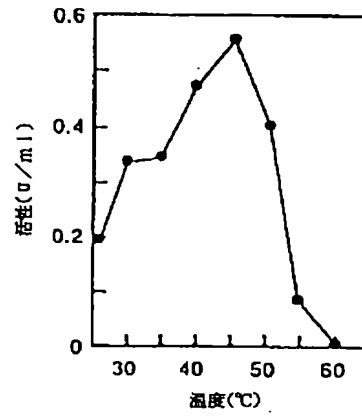
【図3】



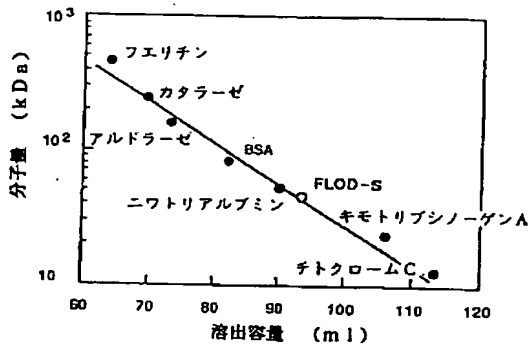
【図2】



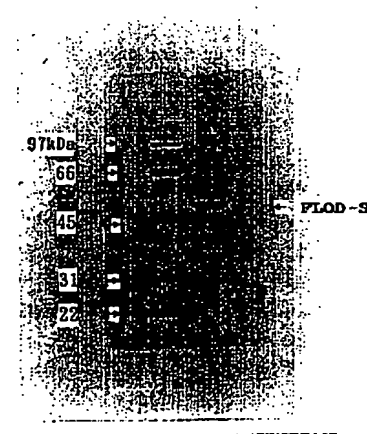
【図4】



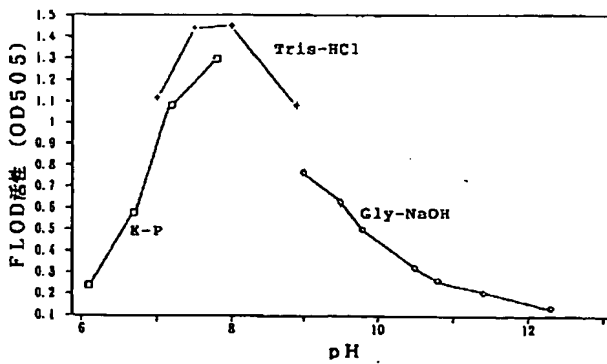
【図5】



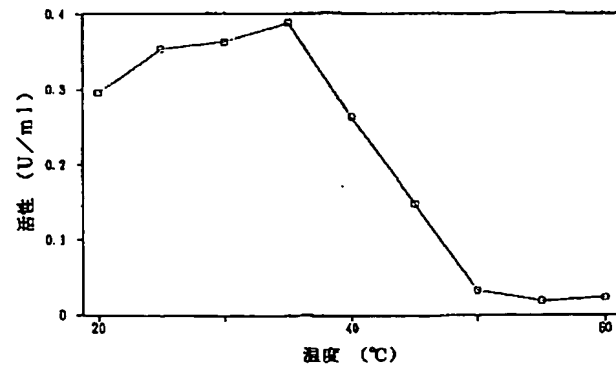
【図6】



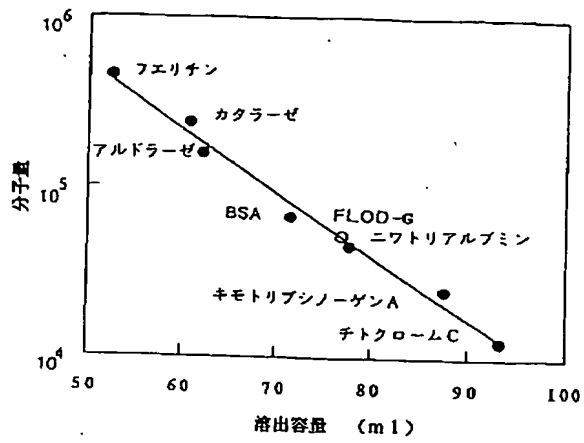
【図7】



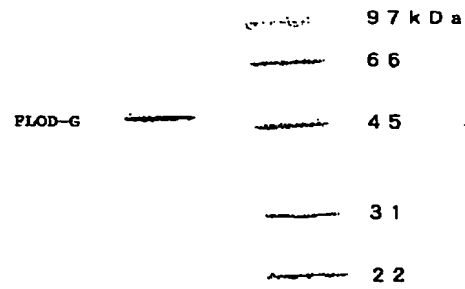
【図8】



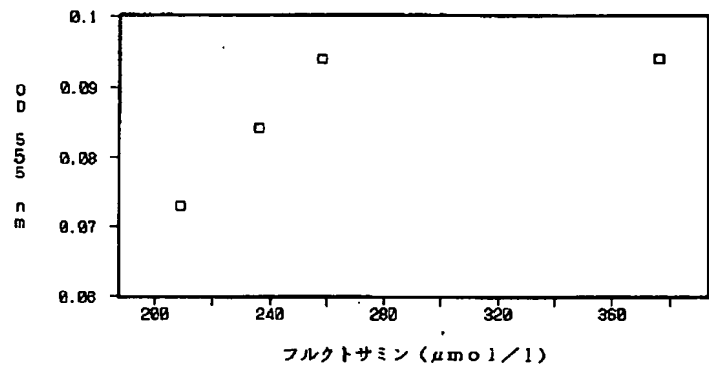
【図 9】



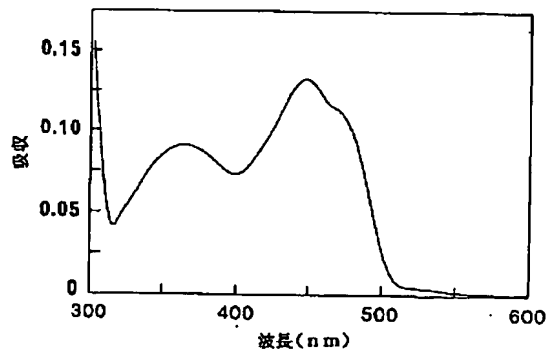
【図 10】



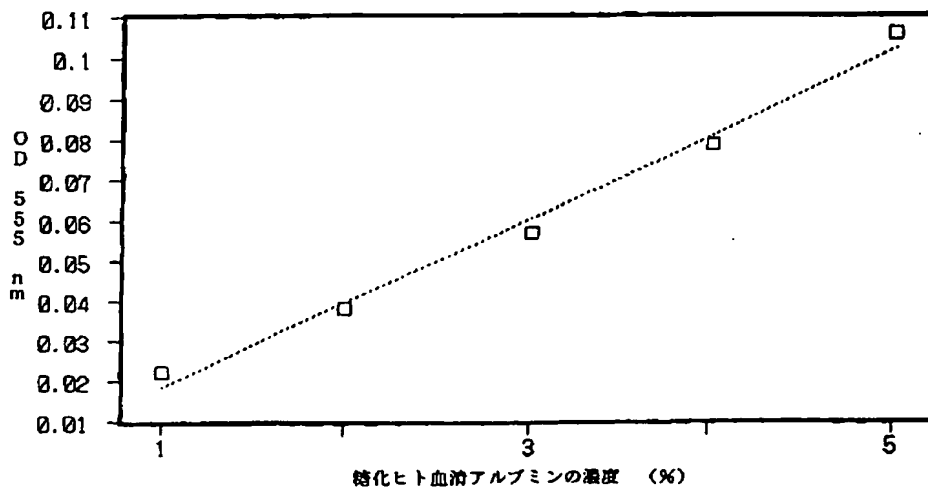
【図 14】



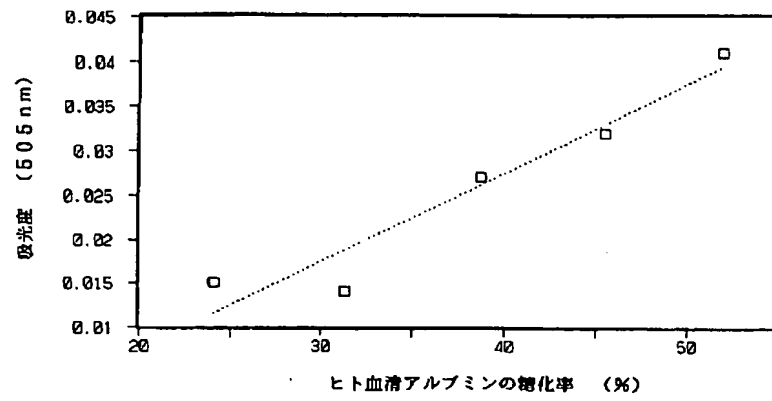
【図 11】



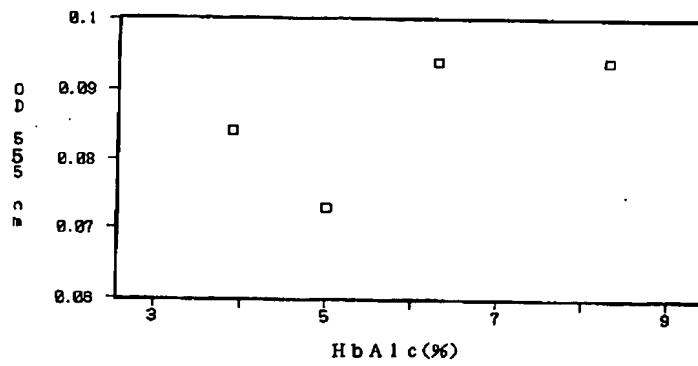
【図 12】



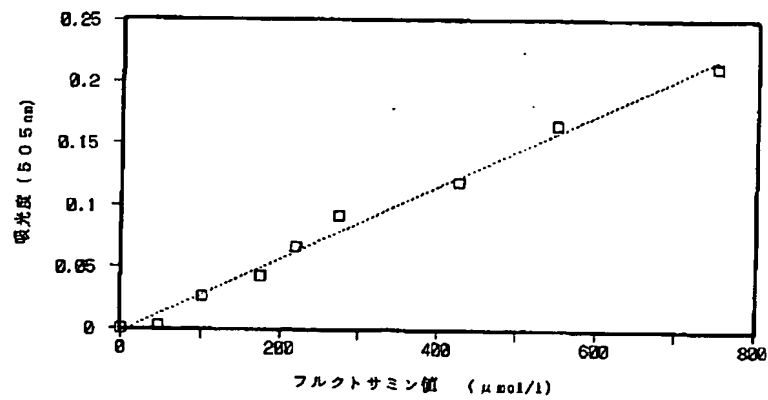
【図13】



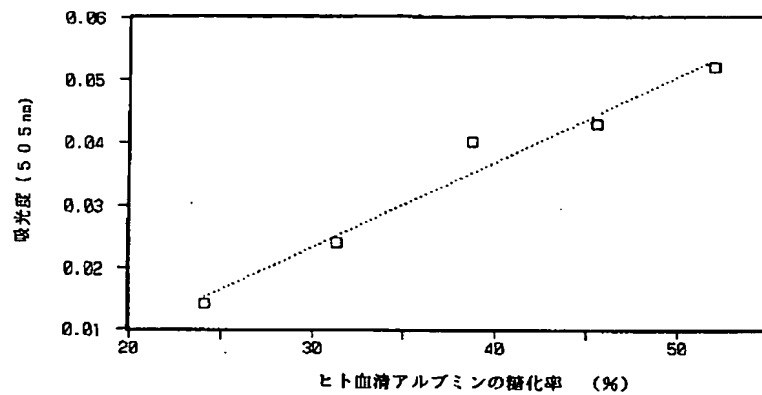
【図15】



【図16】



【図 17】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 R 1:645)				
(C 1 2 N 9/06				
C 1 2 R 1:77)				
(C 1 2 N 1/14				
C 1 2 R 1:77)				
(C 1 2 N 1/14				
C 1 2 R 1:645)				
(72) 発明者 八木 雅之 京都府京都市右京区西京極三反田町 1 西 京極団地 4 棟 302 号室	(72) 発明者 船津 文代 大阪府枚方市茄子作 4 丁目 40 番 2 号			

【公報種別】特許法第 1 7 条の 2 の規定による補正の掲載

【部門区分】第 1 部門第 1 区分

【発行日】平成 1 1 年 (1 9 9 9) 1 0 月 2 6 日

【公開番号】特開平 7 - 2 8 9 2 5 3

【公開日】平成 7 年 (1 9 9 5) 1 1 月 7 日

【年通号数】公開特許公報 7 - 2 8 9 3

【出願番号】特願平 7 - 4 2 8 8 0

【国際特許分類第 6 版】

C12N 9/06

C07C 229/46

C12N 1/14

C12Q 1/26

// (C12N 9/06

C12R 1:645)

(C12N 9/06

C12R 1:77)

(C12N 1/14

C12R 1:77)

(C12N 1/14

C12R 1:645)

【 F I 】

C12N 9/06 B

C07C 229/46

C12N 1/14 A

C12Q 1/26

【手続補正書】

【提出日】平成 1 0 年 1 2 月 2 日

【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正内容】

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ジベレラ属が生産する酵素であって、下記の理化学的特性を示すフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ：

1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；

2) 安定 pH は 4 ~ 1 2、至適 pH は 8 であり；

3) 安定温度は 2 0 ~ 5 0 $^{\circ}$ C、至適温度は 3 5 $^{\circ}$ C であり；

4) ゲルろ過法で求めた分子量が約 4 7, 0 0 0 であり、SDS-PAGE により求めた分子量が約 5 2, 0 0 0 である。

【請求項 2】 前記ジベレラ属が、ジベレラフジクロイであることを特徴とする請求項 1 に記載のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ。

【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 1

【補正方法】変更

【補正内容】

【0 0 0 1】

【産業上の利用分野】本発明は、新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼに関し、さらに詳しくは、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はジベレラ属 (*Gibberella*) の菌由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ、該酵素の製造方法、該酵素を用いたアマドリ化合物の分析法、及び該酵素を含有する試薬及びキットに関する。また本発明は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養のために有用な、該酵素の基質としてのフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N $^{\circ}$ -Z-リジンの製造方法、並びにフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌のスクリーニング及び／又は培養のためのフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N $^{\circ}$ -Z-リジン含有培地を提供するものである。

【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0 0 0 7

【補正方法】変更

【補正内容】

【0007】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、アマドリ化合物、特に糖化タンパクに特異的に作用する新規なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供することを目的として鋭意研究を重ねた結果、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はジベレラ属 (*Gibberella*) の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジンの存在下で培養すると、目的の酵素が産生されることを見出し、本発明を完成するに至った。即ち、本発明は、フサリウム属 (*Fusarium*) 又はジベレラ属 (*Gibberella*) の菌を、フルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン含有培地で培養することにより産生されるフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを提供するものである。本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生菌の培養に用いるフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン含有培地は、グルコースと、リジン及び／又は N° -Z-リジンとを温度 100～150℃において3～60分間、オートクレーブ処理することにより得られるフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン（以下、FZLと略称することもある）を含有する。従って、本発明のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼはフルクトシルリジン及び／又はFZLに特異的に作用する酵素である。なお、本明細書中では、本発明のフルクトシルリジン及び／又はFZLに特異的なフルクトシルアミノ酸オキシダーゼをフルクトシルリジン・オキシダーゼ(fructosyl lysine oxidase)と同意義に用いることとし、以下、FLODと略称することもある。本発明の酵素は、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生能を有するフサリウム属又はジベレラ属の菌をフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン含有培地で培養することにより製造することができる。

【手続補正4】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0008

【補正方法】変更

【補正内容】

【0008】そのようなフサリウム属の菌として、フサリウム・オキシスポルム S-1 F4 (*Fusarium oxysporum* S-1 F4) (FERM BP-5010) を挙げることができる。また、ジベレラ属の菌として、ジベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6356) (*Gibberella fujikuroi*) 又はジベレラ・フジクロイ (IFO NO. 6605) (*Gibberella fujikuroi*) などの種を挙げることができる。

【手続補正5】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

【補正内容】

【0010】上記のごとく、フルクトシルリジン及び／又はFZLはグルコース0.01～50重量%とリジン及び／又は N° -Z-リジン0.01～20重量%とを含む水溶液を、100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することにより、0.01～0.5%のフルクトシルリジン及び／又はフルクトシル N° -Z-リジン水溶液として得ることができる（図1）。好ましくは、全量1000mlの溶液中にグルコース200g、 N° -Z-リジン10gを溶解させ、通常、120℃、20分間オートクレーブ処理する。精製フルクトシル N° -Z-リジンは、上記の本発明の方法で得られたFZL水溶液を逆相クロマトグラフィ又はイオン交換クロマトグラフィで精製することにより、得ることができる。フルクトシルリジン及び／又はFZL含有培地は、上記の本発明の方法で得られたフルクトシルリジン及び／又はFZLを通常の培地に添加することによっても調製できるが、適当な混合物、即ち、グルコース0.01～50重量%、リジン及び／又は N° -Z-リジン0.01～20重量%、 K_2HPO_4 0.1重量%、 NaH_2PO_4 0.1重量%、 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05重量%、 $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.01重量%及び酵母エキス0.2重量%を含有する混合物（好ましくはpH5.6～6.0）を100～150℃において3～60分間オートクレーブ処理することによっても得られる。該培地は新規であり、フルクトシルリジン及び／又はFZLを基質とするFLOD産生菌のスクリーニング及び／又は培養に有用であり、FLODの開発及び研究に貢献するものである。本発明の培地は、該培地で増殖可能なあらゆる種類の菌のスクリーニングに使用することができ、そのような菌として、真菌類、例えば、フサリウム属 (*Fusarium*)、ジベレラ属 (*Gibberella*)、ペニシリウム属 (*Penicillium*)、アスペルギルス属 (*Aspergillus*) 等、細菌類、例えばコリネバクテリウム属 (*Corynebacterium*) 等の菌を挙げることができるが、これらに限定されない。従って、本発明はまた、上記の培地を提供するものである。

【手続補正6】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0013

【補正方法】変更

【補正内容】

【0013】しかしながら、本発明の目的から、FLODは、その精製度にかかわらず、アマドリ化合物の酸化反応を触媒することができる限り、培養液をはじめとする、あらゆる精製段階の酵素含有液を包含する。また、酵素分子の内、触媒活性に関与する部位のみでも、本発明目的を達成することができることから、任意の、アマドリ化合物酸化活性を有するフラグメントをも包含する。

ものとする。このようにして得られたF L O Dは、アマドリ化合物の定量、特に糖尿病の診断のための糖化タンパクの定量に有用である。従って、本発明は、遊離又は保護基を有するアミノ酸の糖化物及び/又はタンパクの糖化物を含有する培地で、真菌類を培養することによって該真菌類にフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生させることを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。さらに、本発明は、フサリウム属又はジベレラ属に属し、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼを産生することができる菌株をフルクトシルリジン及び/又はフルクトシルN[°]-Z-リジン含有培地に培養し、培養物からフルクトシルアミノ酸オキシダーゼを回収することを特徴とする、フルクトシルアミノ酸オキシダーゼの製造方法を提供するものである。これらの属の菌株が産生するF L O Dはいずれも本発明が解決すべき技術的な課題の解決に有用である。しかしながら、その理化学的な性質がやや異なっており、本明細書では、適宜、必要に応じてフサリウム・オキシスポルムS-1 F 4由来のF L O DをF L O D-S、ジベレラ・フジクロイ由来のF L O DをF L O D-Gと呼称する。以下、本発明を詳しく説明する。

【手続補正 7】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0028

【補正方法】変更

【補正内容】

【0028】(I I) ジベレラ属によって産生されるF L O D類

該F L O D-G類は一般に、下記の理化学的特性を有する。

1) 酸素の存在下でアマドリ化合物を酸化し、 α -ケトアルデヒド、アミン誘導体及び過酸化水素を生成する反応を触媒し；

2) 至適p Hは8.0であり；

3) 安定温度は20～50℃、至適温度は35℃であり；

4) スーパーデックス200pgを用いたゲルろ過法で測定した場合、分子量は約47,000(47kDa)である。

【手続補正 8】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0029

【補正方法】変更

【補正内容】

【0029】該F L O D-Gの特性を詳細に説明する。

1. 一般的な誘導特性

F L O D-Gはフルクトシルリジン及び/又はフルクトシルN[°]-Z-リジン(F Z L)によって誘導される誘導酵素であり、フルクトシルリジン及び/又はF Z Lを窒素源とし、グルコースを炭素源とするフルクトシルリジン及び/又はF Z L含有培地で、ジベレラ属のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼ産生性菌株を培養することにより産生される。F L O D-Gは、グルコースとリジン及び/又はN[°]-Z-リジンを共にオートクレーブして得られるG L 褐変化培地で誘導されるが、グルコースとリジン及び/又はN[°]-Z-リジンを別々にオートクレーブ処理して調製した培地では誘導されないことから、該酵素はアマドリ化合物に特異的に作用するものである。

【手続補正 9】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0037

【補正方法】変更

【補正内容】

【0037】7. 既知の酵素との比較

既存の菌由来フルクトシルアミノ酸オキシダーゼと、本発明のF L O D-Gとを比較した。

表9 種々の微生物由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼの比較

【表 9】

産生菌	ジベレラ・フジクロイ IFO 6356	コリネバクテリウム sp. 11	アスペルギルス sp. 21
分子量 (ゲルろ過) (SDS-PAGE)	47,000 52,000	88,000 44,000	83,000 43,000
補酵素	FADと共有結合	FADと非共有結合	FADと非共有結合
基質特異性(U/mg・タンパク) (フルクトシルリジン) (フルクトシルバリン)	48.3 ⁴¹ N.D.	N.D. ⁴² 7.09	11.28 ⁴¹ 59.8
ミハエリス定数	0.13mM (FZLについて)	0.74mM (フルクトシルグリシンについて)	2.2mM (フルクトシルグリシンについて)
至適pH	8.0	8.3	7.7
至適温度(℃)	35	40	40
SH試薬による 影響	あり	なし	あり

1) : ホリウチら (T.Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 53(1), 103-110 (1989)

2) : ホリウチら (T.Horiuchi et al.) Agric. Biol. Chem., 55(2), 333-338 (1991)

3) : フルクトシルN^o-Z-リジンに対する比活性

4) : N- α -フルクトシルN^o-ホルミルリジンに対する比活性

表9から、本発明のFLOD-Gと他の2種の菌株由来のフルクトシルアミノ酸オキシダーゼとの間に、下記の相違点が認められる。

(1) 分子量の相違 : 本発明のFLOD-Gは、単量体として産生されているのに対し、他の2種の酵素は二量体として産生されている。

(2) 補酵素 : FLOD-Gは補酵素として共有結合的に結合したFADを有するのに対し、他の酵素はいずれも非共有結合的に結合したFADを有する。

(3) 基質特異性 : FLOD-Gは、フルクトシルバリンには作用せず、フルクトシルリジンに特異的であるが、コリネバクテリウム属由来の酵素はフルクトシルリジンには作用せず、アスペルギルス属由来の酵素はフルクトシルリジンに作用するものの、フルクトシルバリンに対する活性に比べて、その活性が低い。

(4) ミハエリス定数 : FLOD-Gの基質フルクトシルリジンに対する親和性が、他の酵素のそれよりも高いことを示している。

(5) 至適pH、至適温度、及びSH試薬による阻害等の差異はFLOD-Gと他の2酵素との相違を示している。

【手続補正10】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0038

【補正方法】変更

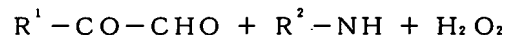
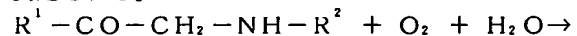
【補正内容】

【0038】既述のごとく、フサリウム属及びジベレラ*

45mM 4-アミノアンチピリン溶液

-補 4-

* 属由来の菌により、本発明方法に従って産生されたFLODは、アマドリ化合物の定量に有用である。従って、本発明はまた、アマドリ化合物を含有する試料と、本発明のFLODとを接触させ、酸素の消費量又は過酸化水素の発生量を測定することを特徴とする、試料中のアマドリ化合物の分析法を提供するものである。本発明の分析法は、生体成分中の、糖化タンパクの量及び/又は糖化率の測定、あるいはフルクトサミンの定量に基づいて行われる。FLODの酵素活性は下記の反応に基づいて測定される。



(式中、R¹はアルドース残基、R²はアミノ酸、タンパク質又はペプチド残基を表す)

被検液としては、アマドリ化合物を含有する任意の試料溶液を用いることができ、例えば、血液(全血、血漿又は血清)、尿等の生体由来の試料の外、醤油等の食品が挙げられる。

【手続補正11】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0053

【補正方法】変更

【補正内容】

【0053】実施例6 フルクトシルポリリジンの定量
0.1%のフルクトシルポリリジン溶液をBMY・NB
T検定法を用いて検定したところ、750 μ mol/lのフルクトサミンを含有することが分かった。この溶液を蒸留水で希釈することにより、0~750 μ mol/lの範囲で変化する一連の試料を作成した。各希釈液について、同量の0.05%トリブシンと混合し、37℃で1時間インキュベートした。その後、各前処理試料から一部をとり出し、以下のように調製された反応液に加えた。

50 μ l

60mM フェノール溶液	50 μ l
60ユニット/ml パーオキシダーゼ溶液	50 μ l
0.1M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0)	500 μ l
7.6ユニット/ml FLOD-G 溶液	30 μ l

蒸留水で全量を1300 μ lとした。7.6ユニット/ml FLOD-G 溶液は、実施例5の方法で得たジベレラ由来のFLOD-Gを7.6ユニット/mlになるよう、0.1M Tris-HCl 塩酸緩衝液 (pH 8.0) で希釈して調製した。この反応液を30℃でインキュベートし、各処理試料を200 μ l加え、30分後の505nmにおける吸光度を測定した。この方法で得られるフルクトサミンと吸光度との関係を図16に示す。図中、縦軸は505nmの吸光度 (過酸化水素の量に対応)、横軸はフルクトサミン値を表す。図は、フルクトサミン値と過酸化水素発生量が相関関係にあることを示している。

【手続補正12】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】図面の簡単な説明

【補正方法】変更

【補正内容】

【図面の簡単な説明】

【図1】 1%のN^o-Z-リジンをオートクレーブ処理することによるフルクトシルN^o-Z-リジンの生成量とグルコース濃度との関係を示すグラフ。

【図2】 FLODの培養培地での産生量と培養時間の関係を示すグラフ。

【図3】 S-1F4由来FLOD-Sの溶媒中での活性とpHの関係を示すグラフ。

【図4】 S-1F4由来FLOD-Sの溶媒中での活性と温度の関係を示すグラフ。

【図5】 セファクリルS-200を用いたゲルろ過によるS-1F4由来FLOD-Sの分子量測定の結果を示すグラフ。

【図6】 S-1F4由来精製FLOD-SをSDS-

PAGEにかけて得た電気泳動による移動パターンを示す写真の模写図。

【図7】 ジベレラ由来FLOD-Gの溶媒中での活性とpHの関係を示すグラフ。

【図8】 ジベレラ由来FLOD-Gの溶媒中での活性と温度の関係を示すグラフ。

【図9】 ジベレラ由来精製FLOD-Gをスーパーデックス200pgを用いたゲルろ過により分子量測定した結果を示すグラフ。

【図10】 ジベレラ由来精製FLOD-GをSDS-PAGEにかけて得た電気泳動による移動パターンを示す写真の模写図。

【図11】 精製S-1F4由来FLOD-Sの吸収スペクトル。

【図12】 基質として用いた糖化ヒト血清アルブミンの濃度と、FLOD作用により生成された過酸化水素の量との関係を示すグラフ。

【図13】 アルブミンの糖化率と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

【図14】 糖尿病患者の血清中のフルクトサミン値とFLOD-Sによる糖化タンパク濃度測定値との関係を示すグラフ。

【図15】 糖尿病患者の全血中のヘモグロビンA1c値とFLOD-Sによる糖化タンパク濃度測定値との関係を示すグラフ。

【図16】 フルクトサミン値と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

【図17】 アルブミンの糖化率と、FLOD作用により生成された過酸化水素量との関係を示すグラフ。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record.**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☒ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning these documents will not correct the image
problems checked, please do not report these problems to
the IFW Image Problem Mailbox.**